

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION
(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 14 juin 2000 (14.06.00)	Assistant Commissioner for Patents United States Patent and Trademark Office Box PCT Washington, D.C.20231 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
Demande internationale no PCT/FR99/02628	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340302/17560
Date du dépôt international (jour/mois/année) 28 octobre 1999 (28.10.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 28 octobre 1998 (28.10.98)
Déposant MARLIERE, Philippe etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

16 mai 2000 (16.05.00)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Kiwa Mpay
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCEDate d'expédition (jour/mois/année)
26 mars 2001 (26.03.01)Référence du dossier du déposant ou du mandataire
340302/17560Demande internationale no
PCT/FR99/02628

NOTIFICATION IMPORTANTE

Date du dépôt international (jour/mois/année)
28 octobre 1999 (28.10.99)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

 le déposant l'inventeur le mandataire le représentant commun

Nom et adresse

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone

01-45-00-92-02

no de télécopieur

01-45-00-46-12

no de télécopieur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

 la personne le nom l'adresse la nationalité le domicile

Nom et adresse

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

Nationalité (nom de l'Etat)

Domicile (nom de l'Etat)

no de téléphone

01-44-29-35-00

no de télécopieur

01-44-29-35-99

no de télécopieur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

 à l'office récepteur aux offices désignés concernés à l'administration chargée de la recherche internationale aux offices élus concernés à l'administration chargée de l'examen préliminaire international autre destinataire:Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé:

Sean Taylor

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

no de téléphone (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 19 novembre 1999 (19.11.99)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340302/17560	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR99/02628	Date du dépôt international (jour/mois/année) 28 octobre 1999 (28.10.99)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 28 octobre 1998 (28.10.98)
Déposant	
INSTITUT PASTEUR etc	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un astérisque(*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Date de prioritéDemande de priorité n°Pays, office régional ou
office récepteur selon le PCTDate de réception du
document de priorité

28 oct 1998 (28.10.98) 98/13533

FR

12 nove 1999 (12.11.99)

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Philippe Bécamel no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 12 FEB 2001

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

PCT

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340302/17560	POUR SUITE A DONNER	voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)
Demande internationale n° PCT/FR99/02628	Date du dépôt international (jour/mois/année) 28/10/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 28/10/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12P21/02		
Déposant INSTITUT PASTEUR et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I Base du rapport
- II Priorité
- III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV Absence d'unité de l'invention
- V Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI Certains documents cités
- VII Irrégularités dans la demande internationale
- VIII Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 16/05/2000	Date d'achèvement du présent rapport 08.02.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Steffen, P N° de téléphone +49 89 2399 7307



THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/02628

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17).) :

Description, pages:

1-25 version initiale

Revendications, N°:

1-51 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
 - la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
 - la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
 - déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
 - La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

- #### 4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description, pages :
 - des revendications, n°s :
 - des dessins, feuilles :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02628

5. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 9,10,13-17,19,22,27-32,34-43,46
	Non : Revendications 1-8,11,12,18,20,21,23-26,33,44,45,47-51
Activité inventive	Oui : Revendications 9,10,13-17,19,22
	Non : Revendications 1-8,11,12,18,20,21,23-51

Possibilité d'application industrielle Oui : Revendications 1-51

Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: LEMEIGNAN B. ET AL.: 'Phenotypic suppression by incorporation of an alien amino acid' JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 231, no. 2, mai 1993 (1993-05), pages 161-166.

La présente demande concerne des méthodes permettant à des cellules d'acquérir la capacité d'intégrer dans des protéines cibles au moins un acide aminé non conventionnel, caractérisées par les étapes telles que décrites dans la revendication 1. Elle concerne de plus des méthodes de sélection basées sur ladite méthode, des cellules, des utilisations, des procédés de production de protéines contenant au moins un acide aminé non conventionnel ainsi que d'autres spécifications liées aux méthodes sus-décrites. Toutes les revendications réfèrent de manière directe ou indirecte à la revendication 1.

L'objet des revendications 9, 10, 13-17, 19 et 22 n'est pas anticipé par les documents présents au dossier et n'est pas évident pour l'homme de métier confronté avec l'état de la technique. En conséquence, les revendications 9, 10, 13-17, 19 et 22 sont en accord avec les articles 33(2) et 33(3) PCT. De plus les revendications 27-32, 34-43 et 46 ne sont pas anticipés par les documents présents au dossier et sont en accord avec l'article 33(2) PCT.

Les revendications 1-8, 11, 12, 18, 20, 21, 23-26, 33, 44, 45, 47-51 ne sont pas nouvelles contrairement aux exigences de l'article 33(2) PCT, pour les raisons suivantes.

La méthode décrite dans D1, comprend toutes les étapes caractéristiques a)-c) de la revendication 1 (D1, page 162, colonne de droite, deuxième moitié et page 163, colonne de gauche et figure 2) et fait également appel à l'introduction d'acides aminés non conventionnels dans des protéines. Ce recouvrement est dû à une ambiguïté dans le point c) de la revendication 1, où on ne sait distinguer si l'acide aminé utilisé dans le milieu de culture correspond à l'acide aminé du codon cible **avant mutagen`se** (type sauvage) ou

THIS PAGE BLANK (USPTO)

à l'acide aminé codé par le codon cible apr` s introduction d la mutation faux-sens (S.V.P. voir aussi le point VIII. de la présente communication). Pour cette raison l'objet de la revendication 1 est anticipé par D1. De la même manière les revendications 2-8, 11, 12, 18, 20, 21, 23-26, 33, 44, 45, 47-51, qui réfèrent directement ou indirectement à la revendication 1, sont anticipées par D1.

En conséquence l'objet des revendications 1-8, 11, 12, 18, 20, 21, 23-26, 33, 44, 45, 47-51 n'est ni nouveau ni inventif selon les critères des articles 33(2) et 33(3) PCT.

De plus les revendications 27-32, qui dépendent de la revendication 25, ainsi que les revendications 34-43 et 46, qui dépendent des revendications 33 ou 25, sont des spécifications supplémentaires évidentes pour l'homme de métier, une fois le contenu des revendications 25 et 33 révélé. Pour cette raison l'objet des revendications 27-32, 34-43 et 46 ne peut être considéré comme étant basé sur une activité inventive, contrairement aux exigences de l'article 33(3) PCT.

Concernant le point VIII**Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes concernent les articles 5 et 6 PCT.

La revendication 1 manque de clarté pour les raisons suivantes. Le terme "transformation" est ambigu car dans le contexte de cellules il fait référence à l'introduction d'ADN dans ces cellules, or ici il est fait référence à l'introduction d'une mutation faux sens. Le terme "une protéine nécessaire à la croissance des dites cellules" est ambigu, car cette condition dépend aussi des milieux de croissance choisis. Finalement le point c) par rapport à "l'acide aminé codé par ledit codon cible" est ambiguë et pas claire, car ici il ne peut pas être jugé au point c) si "l'acide aminé codé par ledit codon cible" réfère au codon original avant mutation ou au codon tel qu'il est après introduction de la mutation faux-sens. La revendication 1 manque également de support dans la description parce qu'elle fait référence de manière trop générale à l'introduction d'une quelconque mutation faux-sens au niveau de n'importe lequel codon cible, mutation dont l'effet peut être supprimé par la croissance en présence d'acide aminé codé par ledit codon cible avant mutation. Les seuls exemples présentés, réfèrent à l'échange précis d'un codon cible codant la cystéine (i.e.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

revendication 9) pour un codon valine ou isoleucine (i.e. revendication 10). Il est à douter que, vu l'emploi des codons et la fonction des enzymes qui garantissent cet emploi ainsi que l'importance de certains résidus d'acides aminés dans les protéines, la méthode de la revendication 1, soit transposable à n'importe quel échange codon cible en codon faux-sens de manière générale pour tous les codons existants. Dans la mesure où la revendication 1 engendrerait de ce fait des échanges codon cible codon faux-sens qui ne donnent pas lieu à une méthode fonctionnelle, ladite revendication serait également contraire à l'article 5 PCT. Cette dernière objection, sous les articles 5 et 6 PCT, vaut de manière analogue également pour les revendications 2-8, 11-21 et 23-51 qui sont toutes d'un caractère plus général.

Les termes suivants sont peu clairs et/ou vagues et rendent donc confus l'objet des revendications respectives: "acide aminé non conventionnel" dans les revendications 1, 13, 15, 19, 25, 26, 36, 37; "faible volume stérique" dans la revendication 6; "acide aminé amphiphile", revendication 7; "sensiblement égal", revendication 8; "un gène d'un intérêt homologue ou hétérologue", revendication 30; "capable de réagir de manière sélective", revendication 33; "pour la fonctionnalisation de protéine", revendication 35.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 340302/17560	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/FR99/02628	International filing date (day/month/year) 28 October 1999 (28.10.99)	Priority date (day/month/year) 28 October 1998 (28.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 21/02		
Applicant INSTITUT PASTEUR		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 May 2000 (16.05.00)	Date of completion of this report 08 February 2001 (08.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02628

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages _____ 1-25 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____ 1-51 _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02628

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	9,10,13-17,19,22,27-32,34-43,46	YES
	Claims	1-8,11,12,18,20,21,23-26,33,44,45,47-51	NO
Inventive step (IS)	Claims	9,10,13-17,19,22	YES
	Claims	1-8,11,12,18,20,21,23-51	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-51	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following document:

D1 : LEMEIGNAN B. ET AL.: 'Phenotypic suppression by incorporation of an alien amino acid' JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 231, no.2, May 1993 (1993-05), pages 161-166.

The present application relates to methods for imparting to cells the capability to integrate, in target proteins, at least one non-standard amino acid, characterised by the steps described in Claim 1. In addition, it relates to methods of selection based on the aforementioned method, to cells, to uses thereof, to methods for producing proteins containing at least one non-standard amino acid, as well as other specifications related to the above methods. All the claims, refer directly or indirectly to Claim 1.

The subject matter of Claims 9, 10, 13-17, 19 and 22 is not anticipated by the documents filed, and it is not obvious to a person skilled in the art on the basis of the prior art. Consequently, Claims 9, 10, 13-17, 19 and 22 meet the requirements of PCT Articles 33(2) and 33(3). In

THIS PAGE BLANK (USPTO)

addition, Claims 27-32, 34-43, and 46 are not anticipated by the documents filed, and meet the requirements of PCT Article 33(2).

Contrary to the requirements of PCT Article 33(2), Claims 1-8, 11, 12, 18 20, 21, 23-26, 33, 44, 45, 47-51, are not novel, for the following reasons.

The method described in D1 comprises all the characteristic steps (a) to (c) of Claim 1 (D1, page 162, right-hand column, second half and page 163, left-hand column and Figure 2), and also involves the insertion of non-standard amino acids into proteins. This overlap is due to an ambiguity in point (c) of Claim 1, which makes it impossible to determine whether the amino acid used in the culture medium corresponds to the amino acid of the target codon **before mutagenesis** (wild type) or to the amino acid coded by the target codon **after insertion of the non-sense mutation** (also see Box VIII of the report). For this reason, the subject matter of Claim 1 is anticipated by D1. In the same manner, Claims 2-8, 11, 12 18, 20, 21, 23-26, 33, 44, 45, 47-51, that directly or indirectly refer to Claim 1, are anticipated by D1.

Consequently, the subject matter of Claims 1-8, 11, 12, 18, 20, 21, 23-26, 33, 44, 45, 47-51 is neither novel nor inventive under the criteria set forth in PCT Articles 33(2) and 33(3).

Furthermore, Claims 27-32 that depend on Claim 25, as well as Claims 34-43 and 46 that depend on Claims 33 and 25, are supplementary specifications obvious to a person skilled in the art, once the content of Claims 25 and 33 is disclosed. For this reason, the subject matter of Claims 27-32, 34-43 and 46 can not be considered as being

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02628

based on an inventive step, contrary to the requirements
of PCT Article 33(3).

THIS PAGE BLANK (USPS16)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The following observations relate to the PCT Articles 5 and 6.

Claim 1 lacks clarity for the following reasons: the term "transformation" is ambiguous because in the context of cells it refers to the insertion of DNA in these cells; but here, it refers to the insertion of a non-sense mutation. The expression "a protein is required for the growth of said cells" is ambiguous, as this condition also depends on the chosen growth media. Finally, point (c), with respect to "the amino acid coded by said target codon" is ambiguous and is not clear, because it can not be determined at point (c) if "the amino acid coded by said target codon" refers to the original codon before mutation or to the codon as it is after the insertion of a non-sense mutation. Claim 1 equally lacks support in the description as it refers in a too general manner to the insertion of any non-sense mutation in whichever target codon, wherein the effect of said mutation may be cancelled by the fact that growth takes place in the presence of the amino acid coded by the said target codon before mutation. The only examples provided refer to the actual exchange of a target codon, coding for cystein (i.e. Claim 9) with a valine or isoleucine codon (i.e. Claim 10). It is doubtful if the method described in Claim 1, in view of the use of codons and function of the enzymes ensuring said use as well as the importance of certain amino acid residues in proteins, can be applied to any exchange of a target codon with a non-sense codon in a general manner for all the existing codons. To the extent that Claim 1 would therefore give rise to an exchange of a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02628

VIII. Certain observations on the international application

target with a non-sense codon that does not lead to a functional method, the said claim would also be contrary to PCT Article 5. This last objection, under PCT Articles 5 and 6, applies likewise to Claims 2-8, 11-21, and 23-51, all of which have a more general character.

The following terms are unclear and/or vague, and, therefore, render the object of the respective claims obscure: "non-standard amino acid", in Claims 1, 13, 15, 19, 25, 26, 36, 37; "low steric volume" in Claim 6; "amphiphilic amino acid", Claim 7; "substantially", Claim 8; "a homologous or heterologous gene of interest", Claim 30; "capable of reacting in a selective manner", Claim 33; and, "for protein functionalisation", Claim 35.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02628

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEMEIGNAN B. ET AL.: "Phenotypic suppression by incorporation of an alien amino acid" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 231, no. 2, May 1993 (1993-05), pages 161-166, XP002113371 cited in the application the whole document ---	1-6, 8, 11-13, 18, 20, 21, 23-25, 29, 33, 44, 45, 47-51
A	DÖRING V. ET AL.: "Reassigning Cysteine in the Genetic Code of Escherichia coli" GENETICS, vol. 150, no. 2, October 1998 (1998-10), pages 543-551, XP002113372 page 546, column 2, line 4 -page 547, column 1, line 9 --- ---	1-17 -/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 December 1999

Date of mailing of the international search report

24/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schönwasser, D

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02628

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BAIN J.D. ET AL.: "Ribosome-mediated incorporation of a non-standard amino acid into a peptide through expansion of the genetic code" NATURE, vol. 356, 9 April 1992 (1992-04-09), pages 537-539, XP002113373 the whole document</p> <p>---</p>	
A	<p>IBBA M.: "STRATEGIES FOR IN VITRO AND IN VIVO TRANSLATION WITH NON-NATURAL AMINO-ACIDS" BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS, vol. 13, 1996, pages 197-216, XP002109693 ISSN: 0264-8725 the whole document</p> <p>-----</p>	



THIS PAGE BLANK (USPTO)

H.P

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340302/17560	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 02628	Date du dépôt international (<i>jour/mois/année</i>) 28/10/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (<i>jour/mois/année</i>)) 28/10/1998
Déposant INSTITUT PASTEUR et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).
3. **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

- le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des **dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- suggérée par le déposant.
- parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document Internationale No
PCT/FR 99/02628

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12P21/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LEMEIGNAN B. ET AL.: "Phenotypic suppression by incorporation of an alien amino acid" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 231, no. 2, mai 1993 (1993-05), pages 161-166, XP002113371 cité dans la demande Le document en entier ---	1-6, 8, 11-13, 18, 20, 21, 23-25, 29, 33, 44, 45, 47-51
A	DÖRING V. ET AL.: "Reassigning Cysteine in the Genetic Code of Escherichia coli" GENETICS, vol. 150, no. 2, octobre 1998 (1998-10), pages 543-551, XP002113372 page 546, colonne 2, ligne 4 -page 547, colonne 1, ligne 9 --- -/-	1-17

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 décembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24/01/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Schönwasser, D

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document Internationale No
PCT/FR 99/02628

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BAIN J.D. ET AL.: "Ribosome-mediated incorporation of a non-standard amino acid into a peptide through expansion of the genetic code" <i>NATURE</i>, vol. 356, 9 avril 1992 (1992-04-09), pages 537-539, XP002113373 le document en entier</p> <p>---</p>	
A	<p>IBBA M.: "STRATEGIES FOR IN VITRO AND IN VIVO TRANSLATION WITH NON-NATURAL AMINO-ACIDS" <i>BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS</i>, vol. 13, 1996, pages 197-216, XP002109693 ISSN: 0264-8725 le document en entier</p> <p>-----</p>	

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12P 21/02		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/24922 (43) Date de publication internationale: 4 mai 2000 (04.05.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02628</p> <p>(22) Date de dépôt international: 28 octobre 1999 (28.10.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/13533 28 octobre 1998 (28.10.98) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): MARLIERE, Philippe [FR/FR]; 2, allée Saint-Martin, F-91450 Etiolles (FR). DÖRING, Volker [DE/FR]; 31, rue St Amand, F-75015 Paris (FR). MOOTZ, Henning [DE/DE]; Ziegelstrasse 11, D-35037 Marburg (DE).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Reginbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	
<p>(54) Title: METHOD FOR PRODUCING IN VIVO PROTEINS CHEMICALLY DIVERSIFIED BY INCORPORATING NON-STANDARD AMINO ACIDS</p> <p>(54) Titre: PROCEDE DE PRODUCTION IN VIVO DE PROTEINES CHIMIQUEMENT DIVERSIFIEES PAR INCORPORATION D'ACIDES AMINES NON CONVENTIONNELS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns processes enabling prokaryotic or eukaryotic cells to acquire the capacity to produce proteins whereof the amino acid sequences comprise at least a non-standard amino acid, methods for selecting said cells, methods for producing and purifying said proteins and cells and proteins obtained by said methods and processes. The invention also concerns uses of said cells and proteins in various fields such as therapeutics, cosmetics, diagnosis or biosynthesis or biodegradation of organic compound.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention a pour objet des méthodes permettant à des cellules procaryotes ou eucaryotes d'acquérir la capacité de produire des protéines dont les séquences d'acides aminés comprennent au moins un acide aminé non conventionnel, des méthodes de sélection desdites cellules, des procédés de production et de purification desdites protéines ainsi que les cellules et les protéines obtenues par les méthodes et procédés selon l'invention. L'invention comprend également les applications desdites cellules et protéines dans différents domaines tels que le domaine thérapeutique, cosmétique, diagnostic ou de la biosynthèse ou la biodégradation de composé organique.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**PROCEDE DE PRODUCTION IN VIVO DE PROTEINES
CHIMIQUEMENT DIVERSIFIEES PAR INCORPORATION D'ACIDES AMINES
NON CONVENTIONNELS**

La présente invention a pour objet des méthodes permettant à des cellules 5 procaryotes ou eucaryotes d'acquérir la capacité de produire des protéines dont les séquences d'acides aminés comprennent au moins un acide aminé non conventionnel, des méthodes de sélection desdites cellules, des procédés de production et de purification desdites protéines ainsi que les cellules et les protéines obtenues par les méthodes et procédés selon l'invention. L'invention comprend également les 10 applications desdites cellules et protéines dans différents domaines tels que le domaine thérapeutique, cosmétique, diagnostic ou de la biosynthèse ou la biodégradation de composé organique.

Un nombre croissant de protéines produites massivement par des organismes recombinants sont employées comme catalyseurs dans l'industrie chimique ou comme 15 agents thérapeutiques. La recherche de nouvelles protéines aux fonctions diversifiées est l'objet d'une activité intense, soit en criblant les protéines d'organismes extrémophiles, soit en créant des variants protéiques par mutagénèse et criblage. Toutefois, la variabilité chimique des protéines qui peuvent être produites dans des 20 organismes vivants reste limitée par l'invariance du code génétique, c'est-à-dire restreinte aux combinaisons d'un jeu canonique de 20 acides aminés. Si la descendance des espèces naturelles pouvait être progressivement remodelée dans le laboratoire de manière à adopter différents codes génétiques, l'évolution des protéines 25 pourrait être redirigée et des sources artificielles de biodiversité ainsi établies.

La déviation expérimentale du code génétique est la seule voie qui permettrait 25 de surmonter cette limitation. Un autre code génétique pourrait spécifier un ensemble plus ou moins grand d'acides aminés, un ensemble substitué par des monomères non canoniques ou un ensemble d'acides aminés canoniques parmi lesquels les codons 30 sont redistribués. La spécification d'acides aminés supplémentaires dans des lignées vivantes se prêterait à de multiples applications dont la plus générique serait l'établissement d'une biodiversité artificielle.

L'incorporation, permanente ou transitoire, d'un seul acide aminé supplémentaire, portant un motif chimique qui pourrait réagir sans modifier les acides aminés conventionnels, suffirait à fonder de nouvelles méthodes de fonctionnalisation de protéine. Ceci est justement l'objet de la présente invention.

L'invention a pour objet une méthode permettant à des cellules d'acquérir la capacité de produire une protéine dont la séquence d'acides aminés comprend au moins un acide aminé non conventionnel, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- 5 a) la transformation desdites cellules par au moins une introduction d'une mutation faux-sens au niveau d'un codon cible d'un gène codant pour une protéine nécessaire à la croissance desdites cellules, ladite protéine synthétisée à partir du gène ainsi muté n'étant plus fonctionnelle ;
- 10 b) le cas échéant la culture des cellules obtenues à l'étape a) dans un milieu de culture contenant le nutriment exigé par la perte de fonctionnalité de ladite protéine ainsi mutée ; et
- 15 c) la culture des cellules obtenues à l'étape a) ou b) dans un milieu de culture contenant l'acide aminé codé par ledit codon cible.

On entendra désigner dans la présente description par le terme de protéine également les peptides ou les polypeptides, ainsi que les glycoprotéines correspondantes lorsque lesdites protéines sont glycosylées.

On entendra également désigner dans la présente description par acide aminé non conventionnel tout acide aminé autre que les acides aminés incorporés par les ribosomes au cours de la biosynthèse des protéines synthétisées par les organismes unicellulaires ou pluricellulaires procaryotes ou eucaryotes, ainsi que tout acide aminé incorporé à la place de l'acide aminé devant être normalement incorporé à cette place au regard de la séquence nucléique traduite.

On entendra également désigner dans la présente description par mutation faux-sens, une mutation qui transforme un codon qui représente un acide aminé en un codon qui code pour un autre acide aminé, ce dernier, le cas échéant, ne pouvant remplacer l'acide aminé d'origine pour donner une protéine fonctionnelle dans la protéine à la place du résidu d'acide aminé d'origine.

On entendra également désigner dans la présente description par protéine nécessaire à la croissance de cellules, une protéine qui lorsqu'elle est synthétisée par les cellules de manière fonctionnelle permet auxdites cellules de croître dans des conditions de culture données et qui lorsqu'elle est synthétisée par les cellules de manière non fonctionnelle nécessite l'introduction d'un nutriment supplémentaire dans ledit milieu de culture donné pour permettre auxdites cellules de croître. De telles protéines non fonctionnelles peuvent être par exemple synthétisées par des cellules suite à des mutations conditionnelles telles qu'une mutation de type photosensible.

Afin d'illustrer par un exemple, mais sans s'y limiter, on peut citer notamment la protéine thymidylate synthase de *E. coli* qui présente un site catalytique occupé par la cystéine au niveau de la position 146 de sa séquence d'acides aminés et dont les mutations correspondantes du gène (*thyA*) causent une exigence nutritionnelle pour la thymine ou la thymidine, aucun autre acide aminé ne pouvant remplacer la cystéine à ce site.

On entendra désigner dans la présente description par codon cible, le codon de trois bases nucléotidiques transformé par la mutation faux-sens.

L'invention comprend également une méthode selon l'invention, caractérisée en ce que le milieu de culture de l'étape c) ne contient pas le nutriment exigé par la perte de fonctionnalité de ladite protéine mutée.

Selon l'invention, l'étape c) de culture desdites cellules peut comprendre une série de cultures desdites cellules dans un milieu de culture contenant l'acide aminé codé par ledit codon cible, chacune desdites cultures de la série étant effectuée jusqu'à obtention de la phase stationnaire de croissance et suivie d'un lavage des cellules obtenues, le nombre de cultures de la série étant suffisant pour permettre la sélection de mutations augmentant la suppression de ladite mutation faux-sens dudit gène muté et la propagation de l'allèle correspondant audit gène muté.

L'invention concerne en outre une méthode selon l'invention, caractérisée en ce que la mutation faux-sens est choisie parmi les mutations faux-sens qui ne réversent spontanément qu'à une très faible fréquence, de l'ordre d'un organisme parmi au moins 10^{15} .

De préférence, la mutation faux-sens sera choisie parmi les mutations faux-sens qui transforment un codon cible d'un gène codant pour une protéine nécessaire à la croissance de ladite cellule en un codon qui comparativement au codon cible présente un changement d'au moins deux bases, de manière plus préférée trois bases.

On préfère également les méthodes selon l'invention, caractérisées en ce que le codon cible code pour un acide aminé de faible volume stérique et/ou amphiphile et/ou de volume stérique inférieur ou sensiblement égal au volume stérique de l'acide aminé codé par la mutation faux-sens.

Parmi les codons cibles, on préfère notamment les codons cibles codant pour la cystéine et les mutations faux-sens choisies parmi les mutations faux-sens qui transforment un codon cible en un codon codant pour la valine ou l'isoleucine.

L'invention concerne en outre une méthode selon l'invention, caractérisée en ce que l'étape a) de transformation desdites cellules est réalisée au moyen d'un vecteur

comportant une séquence dudit gène codant pour une protéine nécessaire à la croissance desdites cellules comportant ladite mutation faux-sens, notamment au moyen d'un vecteur plasmidique.

5 De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans lesdites cellules par des méthodes usuelles de recombinaison génétique telles que par exemple la lipofection, l'électroporation ou le choc thermique.

10 Sous un autre aspect, l'invention a pour objet une méthode de sélection de cellules capables de produire une protéine dont la séquence d'acides aminés comprend au moins un acide aminé non conventionnel caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes a), le cas échéant b), et c) d'une méthode selon l'invention, et la sélection des cellules capables de croître à l'étape c).

15 De manière préférée, la méthode de sélection de cellules selon l'invention, comprendra en outre une étape d) de culture des cellules obtenues à l'étape c) dans un milieu de culture contenant ledit acide aminé codé par ledit codon cible, la concentration dudit acide aminé pouvant être à une concentration supérieure à la concentration dudit acide aminé utilisée à l'étape c), et le choix des cellules sensibles à la concentration dudit acide aminé utilisée à l'étape d).

20 On entend désigner par cellule sensible à un composé chimique ou biochimique ou à une concentration donnée dudit composé, une cellule dont la croissance est partiellement ou totalement inhibée lorsqu'elle est cultivée dans un milieu de culture contenant ledit composé chimique ou biochimique ou ladite concentration dudit composé.

25 L'invention comprend également une méthode de sélection de cellules selon l'invention, caractérisée en ce que l'aminoacyl-tRNA synthétase reconnaissant l'acide aminé codé par ladite mutation faux-sens desdites cellules sélectionnées est capable de charger sur un de ses tRNA associés un acide aminé non conventionnel ou un acide aminé autre que ledit acide aminé codé par ladite mutation faux-sens.

30 On entendra désigner dans la présente description par tRNA associé, un tRNA qui est reconnu par l'aminoacyl-tRNA synthétase reconnaissant un acide aminé et qui peut transférer ledit acide aminé.

L'invention comprend en outre une méthode de sélection de cellules mutantes selon l'invention, caractérisée en ce que la séquence nucléique du gène codant pour ladite aminoacyl-tRNA synthétase comporte au moins une mutation comparée à la

séquence du gène sauvage correspondant, ladite mutation n'ayant pas été introduite par une technique de recombinaison génétique.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet les cellules procaryotes ou eucaryotes obtenues par une méthode selon l'invention.

5 Parmi les cellules utilisables à ces fins, on peut citer bien entendu les cellules bactériennes telles que *E. coli*, mais également les cellules de levure, de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères, comme notamment les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO), mais également les cellules d'insectes.

10 L'invention concerne également les cellules procaryotes ou eucaryotes isolées capables de produire une protéine dont la séquence d'acides aminés comprend au moins un acide aminé non conventionnel, caractérisées en ce qu'elles comprennent une aminoacyl-tRNA synthétase reconnaissant un acide aminé donné capable de charger sur un de ses tRNA associés un acide aminé non conventionnel ou un acide 15 aminé autre que ledit acide aminé donné, et en ce que la séquence nucléique du gène codant pour ladite aminoacyl-tRNA synthétase comporte au moins une mutation comparée à la séquence du gène sauvage correspondant, ladite mutation n'ayant pas été introduite par une technique de recombinaison génétique.

20 Ainsi, l'invention concerne une méthode de sélection de cellules basée sur la constitution par la cellule d'une voie métabolique nécessaire à sa croissance permettant d'obtenir des cellules capables de produire un acyl-tRNA non canonique capable de charger un acide aminé non conventionnel.

25 Parmi les cellules selon l'invention, on préfère les cellules de bactérie, caractérisées en ce qu'elles sont choisies parmi les cellules suivantes déposées à la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Paris, France) :

- 30 a) souche *E. coli* déposée à la CNCM sous le N° I-2025 le 25 mai 1998,
- b) souche *E. coli* déposée à la CNCM sous le N° I-2026 le 25 mai 1998,
- c) souche *E. coli* déposée à la CNCM sous le N° I-2027 le 25 mai 1998,
- d) souche *E. coli* déposée à la CNCM sous le N° I-2339 le 26 octobre 1999,
- e) souche *E. coli* déposée à la CNCM sous le N° I-2340 le 26 octobre 1999, et
- f) souche *E. coli* déposée à la CNCM sous le N° I-2341 le 26 octobre 1999.

La souche *E. coli* K12, déposée à la CNCM sous le N° I-2025 et identifiée sous la référence β5366, est un descendant de la souche MG1655 (wt *E. coli* K12), comportant les caractéristiques suivantes :

- délétion au locus thyA et remplacement par un gène de résistance à l'érythromycine,

- porte un plasmide pTZ18 (col E1 replicon, bla⁺) avec l'allèle Cys146GUA de la thymidylate synthase.

5 La souche *E. coli* K12, déposée à la CNCM sous le N° I-2026 et identifiée sous la référence β8144, est un descendant de la souche MG1655 (wt *E. coli* K12), comportant les caractéristiques suivantes :

- délétion au locus thyA et remplacement par un gène de résistance à l'érythromycine,

10 - porte un plasmide pTZ18 (col E1 replicon, bla⁺) avec l'allèle Cys146GUA de la thymidylate synthase.

La souche *E. coli* K12, déposée à la CNCM sous le N° I-2027 et identifiée sous la référence β8146, est un descendant de la souche MG1655 5WT *E. coli* K12), comportant les caractéristiques suivantes :

15 - délétion au locus thyA et remplacement par un gène de résistance à l'érythromycine,

- porte un plasmide pTZ18 (col E1 replicon, bla⁺) avec l'allèle Cys146GUA de la thymidylate synthase.

20 La souche *E. coli* K12, déposée à la CNCM sous le N° I-2339 et identifiée sous la référence β5479, est un descendant de la souche MG1655 (wt *E. coli* K12), comportant les caractéristiques suivantes :

- délétion au locus thyA et remplacement par un gène de résistance à l'érythromycine,

25 - délétion au locus nrdD et remplacement par un gène de résistance à la kanamycine,

- porte l'allèle R223H du gène valS,

- porte un plasmide pTZ18 (col E1 replicon, bla⁺) avec l'allèle Cys146GUA de la thymidylate synthase.

30 La souche *E. coli* K12, déposée à la CNCM sous le N° I-2340 et identifiée sous la référence β5485, est un descendant de la souche MG1655 (wt *E. coli* K12), comportant les caractéristiques suivantes :

- délétion au locus thyA et remplacement par un gène de résistance à l'érythromycine,

35 - délétion au locus nrdD et remplacement par un gène de résistance à la kanamycine,

- porte l'allèle chromosomique Val 276 Ala du gène valS,
- porte un plasmide pTZ18 (col E1 replicon, bla⁺) avec l'allèle Cys146GUA de la thymidylate synthase.

La souche *E. coli* K12, déposée à la CNCM sous le N° I-2341 et identifiée sous 5 la référence β5486, est un descendant de la souche MG1655 (wt *E. coli* K12) comportant les caractéristiques suivantes :

- délétion au locus thyA et remplacement par un gène de résistance à l'érythromycine,
- délétion au locus nrdD et remplacement par un gène de résistance à la 10 kanamycine,
- porte l'allèle chromosomique Asp 230 Asn du gène valS,
- porte un plasmide pTZ18 (col E1 replicon, bla⁺) avec l'allèle Cys146GUA de la thymidylate synthase.

L'invention comprend en outre l'utilisation d'une méthode ou d'une cellule selon 15 l'invention pour la production de protéine, notamment recombinante, dont la séquence d'acides aminés comprend au moins un acide aminé non conventionnel.

Sous un autre aspect, l'invention concerne un procédé de production d'une protéine dont la séquence d'acides aminés comprend au moins un acide aminé non conventionnel, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 20 le cas échéant, la sélection d'une cellule par une méthode selon l'invention ;
- la culture de ladite cellule sélectionnée à l'étape a) ou d'une cellule selon l'invention dans un milieu de culture et des conditions de culture permettant la croissance de ladite cellule ; et
- 25 l'isolement de ladite protéine comprenant au moins un acide aminé non conventionnel à partir du surnageant de culture et/ou du culot cellulaire obtenu à l'étape b).

Parmi les protéines pouvant être produites par un procédé selon l'invention, on peut mentionner, mais sans s'y limiter, les protéines qui par l'incorporation d'au moins 30 un acide aminé non conventionnel permettent d'obtenir une activité recherchée qu'une protéine dont la séquence comporte uniquement des acides aminés conventionnels ne permet pas d'obtenir. Par activité, on entend désigner de manière générale toute activité telle qu'une activité physiologique ou biologique relative aux organismes uni- ou pluricellulaires, même partielle, comme par exemple une activité structurelle ou biochimique, par exemple enzymatique, antigénique, de type anticorps ou de modulation, de régulation ou d'inhibition d'activité biologique, ou encore telle qu'elle 35

permettre sa mise en oeuvre dans un procédé de biosynthèse ou de biodégradation de composés chimiques ou biochimiques.

On peut également mentionner parmi les protéines pouvant être produites par un procédé selon l'invention, les protéines dont l'incorporation d'au moins un acide aminé non conventionnel est effectuée de telle manière qu'il n'en résulte pas de modification approfondie de l'activité biologique de la protéine non modifiée correspondante. Outre l'activité biologique conservée de la protéine non modifiée correspondante, ces protéines selon l'invention présenteront un acide aminé non conventionnel dont les propriétés spécifiques pourront être avantageusement exploitées.

Parmi les propriétés spécifiques conférées par la présence d'un acide aminé non conventionnel, on peut citer en particulier les propriétés liées à la présence d'un groupe fonctionnel sur ledit acide aminé non conventionnel capable de réagir facilement et de manière spécifique avec un composé chimique ou biochimique dans des conditions permettant de ne pas altérer l'activité de la protéine ou évitant la modification des acides aminés conventionnels.

La présence de ce groupe fonctionnel spécifique pourra avantageusement être utilisée par exemple pour :

- (i) purifier toute protéine, notamment recombinante, incorporant ledit acide aminé non conventionnel ;
- (ii) coupler une telle protéine à un support solide ;
- (iii) coupler à une telle protéine des molécules capables d'être détectées, telles que des sondes spectroscopiques de nature variée ;
- (iv) coupler à une telle protéine des polymères lipophiles ou hydrophiles permettant de les solubiliser dans des solvants ou de faire écran à la reconnaissance par des anticorps ;
- (v) coupler une telle protéine à un polynucléotide ;
- (vi) coupler une telle protéine à un composé chimique ou biochimique dont la présence permet d'augmenter, de diminuer, de moduler, de réguler ou de cibler l'activité biologique de ladite protéine, ou de modifier sa biodisponibilité en tant que composé à usage thérapeutique ; ou encore
- (vii) fixer de manière permanente à une telle protéine un coenzyme qui sinon diffuserait en solution.

Selon la présente invention, l'incorporation d'au moins un acide aminé non conventionnel pourra porter sur des acides aminés à l'origine d'une spécificité ou de

l'activité, ou à l'origine de la conformation structurale, de la charge, de l'hydrophobicité ou de la capacité de multimérisation de la protéine non modifiée correspondante. Ainsi, pourront être créées des protéines d'activité équivalente, augmentée ou diminuée, ou de spécificité équivalente, plus étroite, ou plus large que la protéine à acides aminés conventionnels non modifiée correspondante.

Par protéine non modifiée, on entend désigner la protéine sauvage ou recombinante constituée d'acides aminés conventionnels et dont est issue la protéine comprenant l'acide aminé non conventionnel.

De préférence, le procédé de production selon l'invention est caractérisé en ce que ledit milieu de culture de l'étape b) permettant la croissance de ladite cellule contient ledit acide aminé non conventionnel ou un de ses précurseurs.

Selon un mode particulier, un procédé de production selon l'invention est caractérisé en ce que ledit acide aminé non conventionnel est synthétisé par ladite cellule, la synthèse dudit acide aminé non conventionnel pouvant être augmentée par modification génétique de ladite cellule.

L'invention concerne en outre un procédé de production d'une protéine dont la séquence d'acides aminés comprend au moins un acide aminé non conventionnel selon l'invention, caractérisé en ce que ladite cellule est auxotrophe pour l'acide aminé codé par ledit codon cible.

Sont également compris dans la présente invention, les procédés selon l'invention, caractérisés en ce que ladite cellule comprend un gène d'intérêt homologue ou hétérologue dont la séquence codante comporte au moins un codon cible.

D'une manière générale, le gène d'intérêt codera pour un ARN messager qui sera ensuite traduit en protéine d'intérêt.

Le gène d'intérêt peut être isolé par toute technique conventionnelle telle que clonage, PCR (Polymerase Chain Reaction) ou encore synthétisé chimiquement. Il peut être de type génomique (muni d'un ou plusieurs introns) ou ADN complémentaire (ADNc). La protéine d'intérêt peut être constituée par une protéine mature, un précurseur et, notamment un précurseur destiné à être sécrété et comprenant un peptide signal, une protéine tronquée, une protéine chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses ou encore une protéine mutée présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées.

De manière générale, le gène d'intérêt homologue ou hétérologue pourra être choisi parmi les gènes codant pour toute protéine utilisable comme composé thérapeutique ou cosmétique, ou comme réactif de diagnostic, ou encore comme

composé pouvant être mis en oeuvre dans un procédé de biosynthèse ou de biodégradation.

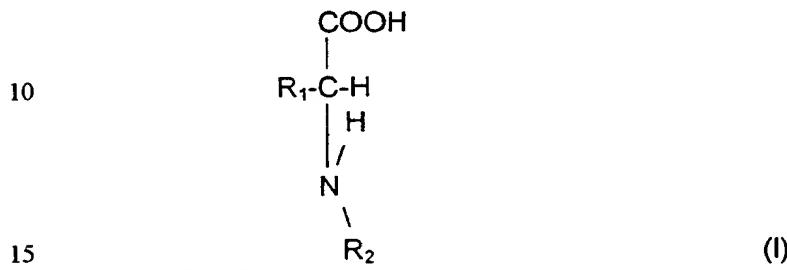
A titre d'exemples, on peut citer les gènes d'intérêt codant pour les protéines d'intérêt suivantes :

- 5 - cytokines ou lymphokines (interférons α , β et γ , interleukines et notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou l'IL-12, facteurs nécrosant des tumeurs (TNF), facteurs stimulateurs de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF, ...)) ;
- récepteurs cellulaires ou nucléaires, notamment ceux reconnus par des organismes pathogènes (virus, bactéries, ou parasites) ou leurs ligands ;
- 10 - protéines impliquées dans une maladie génétique (facteur VII, facteur VIII, facteur IX, dystrophine ou minidystrophine, insuline, protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), hormones de croissance (hGH)) ;
- enzymes (uréase, rénine, thrombine, ...) ou toutes enzymes impliquées dans le métabolisme ou la biosynthèse des protéines, des lipides, des acides nucléiques,
- 15 - des sucres, des acides aminés, des acides gras ou des nucléotides ;
- inhibiteurs d'enzymes (α 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteurs de protéases virales, ...) ;
- composés à effet anti-tumoral capables d'inhiber au moins partiellement l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers (anticorps, inhibiteurs agissant au niveau 20 de la division cellulaire ou des signaux de transduction, produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, par exemple p53 ou Rb, protéines stimulant le système immunitaire, ...) ;
- protéines du complexe majeur d'histocompatibilité des classes I ou II ou protéines régulatrices agissant sur l'expression des gènes correspondants ;
- 25 - protéines capables d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement (protéines antigéniques ayant des propriétés immunogènes, épitopes antigéniques, anticorps, ...) ;
- toxines telles que la ricine, toxine cholérique, diphtérique, ... ou immunotoxines ;
- marqueurs (β -galactosidase, peroxydase, ...) ; et
- 30 - luciférase, GFP (green fluorescent protein), etc..

L'invention comprend en outre un procédé de production d'une protéine selon l'invention, caractérisé en ce que le milieu de culture de l'étape b) comprend en outre les composés nécessaires à l'induction de la synthèse de la protéine codée par ledit gène d'intérêt. Ces composés sont connus de l'homme du métier et dépendent notamment de la cellule et du gène homologue ou hétérologue sélectionnés.

L'invention concerne également un procédé selon l'invention, caractérisé en ce que l'activité biologique de la protéine codée par ledit gène d'intérêt est au moins partiellement conservée après l'incorporation dudit acide aminé non conventionnel au niveau du codon cible dudit gène d'intérêt.

5 L'invention concerne en outre un procédé selon l'invention, caractérisé en ce que l'acide aminé non conventionnel est choisi parmi les acides aminés non conventionnels de formule I et de configuration L



dans laquelle :

R₁ ou R₂ représente des radicaux contenant un groupe fonctionnel capable de réagir de manière sélective, de préférence choisi parmi les groupes aldéhyde, cétone, éthényle, éthynyle ou nitrile.

20 Parmi ces groupes, on préfère particulièrement le groupe oxo (aldéhyde ou cétone) à réactivité sélective qui faciliterait la fonctionnalisation chimique des protéines. D'autres groupes simples comme le groupe éthynyle se prêteraient également à des réactions sélectives. Un vaste corpus d'expériences conduites à l'aide de systèmes de traduction acellulaire (ex vivo) et d'acyl-tRNAs synthétisés *in vitro*, a démontré qu'une 25 grande variété de groupes acyles pouvaient être transférés sur le ribosome en réponse à un codon lu par le tRNA. En bref, les modifications latérales des acides aminés semblent toutes compatibles avec la traduction (il n'a à ce jour pas été trouvé d'acide aminé dont la chaîne latérale serait assez encombrante pour bloquer la traduction) ; des substitutions du motif amino en alkyl-amino, en hydroxy et en 30 hydrazino sont compatibles avec la chimie de transpeptidation catalysée par le ribosome (Bain et al. 1991) (il est connu que le ribosome peut former des polyesters en plus des polyamides conventionnels) ; la substitution de l'hydrogène alpha du motif H₂NCH(R)-COOH par un groupe alkyle (méthyle) ou l'inversion de configuration au carbone alpha (D-amino-acides) ne sont par contre pas acceptées par le ribosome.

35 L'invention a également pour objet un procédé selon l'invention, pour la fonctionnalisation de protéine.

L'invention concerne également un procédé de purification de protéine, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) l'incorporation dans la séquence d'acides aminés de ladite protéine d'un acide aminé non conventionnel contenant un groupe fonctionnel capable de réagir de manière sélective par un procédé selon l'invention ;
- b) la mise en contact de la solution contenant la protéine obtenue à l'étape a) avec un support comprenant un composé capable de réagir spécifiquement avec ledit groupe fonctionnel et de fixer spécifiquement ladite protéine ; et
- c) l'isolement de ladite protéine fixée sur le support.

Les procédés de purification de protéine, naturelle ou recombinante, utilisés habituellement par l'homme du métier font appel généralement à des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immuno-affinité à l'aide d'anticorps mono ou polyclonaux spécifiques, etc.. Ces méthodes sont parfois longues et fastidieuses et ne permettent pas toujours d'obtenir l'activité spécifique, le taux et le rendement de purification voulus. La présence d'un groupe fonctionnel spécifique sur la protéine à purifier capable de réagir sélectivement avec le support de purification sans altérer l'activité de la protéine faciliterait grandement la purification de protéine nécessaire à leur utilisation.

L'invention concerne également un procédé de fixation d'une protéine sur un composé chimique ou biochimique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) l'incorporation dans la séquence d'acides aminés de ladite protéine par un procédé selon l'invention d'un acide aminé non conventionnel contenant un groupe fonctionnel capable de réagir de manière sélective ;
- b) la mise en contact de la protéine obtenue à l'étape a) avec ledit composé chimique ou biochimique comprenant un groupe capable de réagir spécifiquement avec ledit groupe fonctionnel dans un milieu permettant la réaction.

De préférence, la fixation d'une protéine sur un composé chimique ou biochimique est une fixation par liaison covalente.

Les composés chimiques ou biochimiques pouvant être utilisés dans ledit procédé de fixation selon l'invention pourront être choisis parmi tous les composés capables de réagir avec le groupe fonctionnel de l'acide aminé non conventionnel incorporé.

On entend désigner dans la présente description par complexe protéique le produit obtenu à l'étape b) du procédé décrit ci-dessus comprenant une protéine selon l'invention fixée sur un composé chimique ou biochimique.

5 L'invention comprend aussi un procédé selon l'invention caractérisé en ce que ledit composé chimique ou biochimique est lui-même fixé sur un support solide ou est un composé constitutif d'un support solide.

L'invention concerne en outre un procédé selon l'invention pour la préparation d'un complexe protéique.

10 De préférence, l'invention comprend les procédés de l'invention, caractérisés en ce que ladite protéine fixée ou ledit composé chimique ou biochimique est choisi parmi les composés thérapeutiques, cosmétiques ou diagnostiques.

15 Ladite protéine fixée sera choisie en particulier parmi les protéines dont la séquence d'acides aminés comprend un acide aminé non conventionnel selon un procédé de l'invention, et dont la protéine non modifiée correspondante sauvage ou recombinante est choisie parmi les protéines utilisables comme composés thérapeutiques, cosmétiques ou comme réactifs de diagnostic.

De préférence, les procédés selon l'invention, sont caractérisés en ce que le composé chimique ou biochimique est choisi parmi les composés capables de modifier l'activité biologique de la protéine fixée.

20 On entend désigner par composés capables de modifier l'activité biologique d'un autre composé, un composé capable d'augmenter, de diminuer, de réguler l'activité biologique dudit autre composé.

L'invention comprend également un procédé selon l'invention, caractérisé en ce que le composé chimique ou biochimique est choisi parmi les composés dont l'activité 25 biologique peut être modifiée par la protéine fixée.

L'invention comprend également un procédé selon l'invention, caractérisé en ce que le composé chimique ou biochimique est choisi parmi les composés comprenant une protéine, un polynucléotide, un acide gras, un sucre ou un polymère naturel ou synthétique.

30 Selon un autre aspect, l'invention a pour objet les protéines, en particulier recombinantes, et les complexes protéiques obtenus par un procédé selon l'invention.

L'invention comprend également une méthode de sélection de composés capables de se lier à une protéine selon l'invention ou capables de se lier au composé chimique ou biochimique du complexe protéique selon l'invention. Parmi ces

méthodes, on peut citer comme exemple une méthode caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- a) la mise en contact dudit composé susceptible d'être sélectionné avec la protéine ou le complexe protéique selon l'invention, ladite protéine ou complexe protéique pouvant notamment fixée sur un support solide ;
- 5 b) la détermination de la capacité dudit composé à se lier avec la protéine ou le complexe protéique selon l'invention.

Les composés susceptibles d'être sélectionnés peuvent être des composés organiques tels que des protéines ou hydrates de carbone ou tous autres composés 10 organiques ou inorganiques déjà connus, ou des composés organiques nouveaux élaborés à partir de techniques de modélisation moléculaire et obtenus par synthèse chimique ou biochimique, ces techniques étant connues de l'homme de l'art.

Les cellules selon l'invention pourront également avantageusement servir de modèle et être utilisés dans des procédés pour étudier, identifier et/ou sélectionner des 15 protéines selon l'invention ou des composés susceptibles de posséder une activité recherchée.

L'invention concerne également l'utilisation d'une protéine ou d'un complexe protéique selon l'invention comme réactif de diagnostic ainsi que les procédés de diagnostic, notamment pour la détection, l'identification, la localisation et/ou le dosage 20 spécifique de polypeptide ou de polynucléotide, mettant en oeuvre une protéine ou un complexe protéique selon l'invention.

Sont en effet comprises dans les protéines selon l'invention, des protéines ayant incorporé au moins un acide aminé non conventionnel et ayant conservé partiellement ou totalement l'activité initiale des protéines sauvages ou recombinantes 25 non modifiées correspondantes, telles que des anticorps, des antigènes, des enzymes ou leurs fragments biologiquement actifs connus pour être utilisés dans des procédés de diagnostic.

De la même manière, sont compris dans les complexes protéiques selon l'invention, des complexes protéiques formés à partir d'une protéine selon l'invention et 30 un composé chimique ou biochimique tels que des complexes comprenant un anticorps, un antigène ou une sonde oligonucléotidique couplé à une enzyme, à un substrat ou à une molécule capable d'être détectée.

Parmi les procédés de diagnostic selon l'invention, on peut citer par exemple les procédés comprenant les étapes suivantes :

a) la mise en contact de l'échantillon biologique susceptible de contenir le composé recherché avec une protéine ou un complexe protéique selon l'invention, ladite protéine ou complexe protéique pouvant être notamment fixée sur un support solide ; et

5 b) la mise en évidence, l'identification, la localisation et/ou le dosage du complexe formé entre le composé recherché et une protéine ou un complexe protéique selon l'invention.

L'homme du métier saura adapter avec les protéines ou les complexes protéiques selon l'invention les procédés de diagnostic standards connus.

10 Les techniques et les réactifs spécifiques permettant la mise en évidence, l'identification, la localisation et/ou le dosage du complexe formé que l'on pourra utiliser dans les procédés de l'invention, sont bien connus également de l'homme du métier et sont, par exemple, les techniques ELISA, RIA, d'immunofluorescence, de PCR ou d'autres techniques d'amplification d'un acide nucléique cible connues de l'homme de
15 l'art.

L'invention concerne également un kit ou nécessaire de diagnostic, notamment pour la détection, l'identification, la localisation et/ou le dosage spécifique de protéine ou de polynucléotide caractérisé en ce qu'il contient une protéine ou un complexe protéique selon l'invention.

20 L'invention concerne en outre l'utilisation d'une protéine, d'un complexe protéique ou d'une cellule selon l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique ou cosmétique.

L'invention a enfin pour objet une composition pharmaceutique ou cosmétique comprenant une protéine, un complexe protéique ou une cellule selon l'invention.

25 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples ci-après.

EXEMPLES

30 **EXEMPLE 1 :** Construction d'une souche d'*E. coli* comportant une mutation faux-sens Cys->Val au site actif de la thymidylate synthase et créant une exigence nutritionnelle pour la thymine, la thymidine ou la cystéine.

Les allèles artificiels du gène thyA sont construits par mutagénèse dirigée du plasmide pTS0 (Lemeignan et al 1993), qui dérive du plasmide pTZ18R (BioRad) par 35 insertion du gène thyA sauvage d'*E. coli*. La mutagénèse dirigée à l'aide d'un

oligonucléotide est réalisée selon la méthode décrite par Kunkel et coll. (1987) sur le phagémide pTS0. La préparation de la matrice simple brin de pTS0, amplifiée dans la souche RZ1032 (Kunkel et coll., 1987) (Hfr KL16 P045 [lysA(61-62)] dut1 ung1 thi1 relA1 supE44 zbd-279::Tn10) est réalisée selon le protocole décrit par Sambrook et coll. (1989). Un oligonucléotide phosphorylé en 5' (acheté à la société Genome Express) est utilisé comme amorce mutagène :

Oligodéoxynucléotide 1 :

5'pTGGATAAAATGGCGCTGGCACCGGTACATGCATTCTCCAGTTCTATGT

L'hybridation de cet oligonucléotide avec la matrice simple brin dans chacune des deux constructions est réalisée avec 10 ng d'oligonucléotide et 0,2 µl de matrice dans un volume de 10 µl d'une solution tampon contenant 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 2 mM d'EDTA et 50 mM de chlorure de sodium. Les tubes sont incubés 5 mn à 70°C puis refroidis progressivement jusqu'à 30°C. A ce mélange est alors ajouté 0,5 mM de chacun des dNTP, 1 mM d'ATP, 10 mM de Tris-HCl à pH 7,5, 10 mM de chlorure de magnésium, 2 mM de dithiothréitol et 1 unité de chacune des deux enzymes du phage T4 ADN ligase et ADN polymérase. Ce mélange réactionnel d'un volume final de 20 µl est incubé 60 min à 37°C dont 5 µl sont ensuite utilisés pour transformer des cellules compétentes de la souche GT869 (Parsot, C. 1986) (thrB1004 pro thi strA hsdS lacZ ΔM15 [F' lacZ ΔM15 lacIq traD36 proA+ proB+]) d'E.coli K12 suivant la méthode décrite par Sambrook et coll. (1989). Les cellules transformées sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB additionné de 100 mg/l de carbénicilline. Douze clones résistant à l'antibiotique sont réisolés sur le même milieu. L'ADN simple-brin correspondant aux phagémides de ces clones est préparé et séquencé selon la méthode didéoxy (Sanger et coll., 1977). Le kit de séquençage M13 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne) et la désoxyadénosine 5'-(α-thio)triphosphate (1300 Ci/mmol, Amersham) sont combinés selon les indications des fournisseurs. Quatre amorces sont utilisées pour déterminer la séquence des allèles de thyA :

Oligodéoxynucléotide 3 : 5'GGTGTGATCATGATGGTC

Oligodéoxynucléotide 4 : 5'CCTGCAAGATGGATTCCC

Oligodéoxynucléotide 5 : 5'CGCGCCGCATTATTGTTTC

Oligodéoxynucléotide 6 : 5'GTCTGGACCGGTGGCGACA

Le plasmide pTS1 ainsi obtenu propage l'allèle thyA:Val146, dans lequel la position 146 occupée dans le gène thyA sauvage par le codon UGC de la cystéine est occupée par le codon GUA de la valine. Le plasmide pTS1 est introduit par transformation, réalisée selon la méthode de Sambrook et coll. (1989), dans la souche

ΔthyA d'*E. coli* K12, β1308 (Lemeignan et coll., 1993), dont le gène chromosomique de la thymidylate synthase, thyA, est déleté. La souche transformée portant l'allèle plasmidique thyA:Val146, β5366, se montre incapable de croître sans que de la thymine ou de la thymidine soit ajoutée au milieu de culture, tout comme la souche 5 β1308 dont elle dérive. Par contre, la souche β5366 montre une croissance marginale à 30°C sur gradient de diffusion de cystéine, réalisé dans des boîtes de Pétri contenant 25 ml de milieu minéral MS glucose à partir d'un puits central comportant 0,1 ml d'une solution 400 mM de L-cystéine. Dans les mêmes conditions, la souche β1308 ne donne lieu à aucune croissance détectable. Ainsi, la mutation faux-sens convertissant 10 la cystéine catalytique à la position 146 de la thymidylate synthase en valine peut être partiellement supprimée par apport massif de cystéine exogène. L'addition de 0,1 mM de valine au milieu des boîtes de Pétri abolit la croissance de la souche β5366 sur gradient de cystéine. Ainsi, tout se passe comme si la cystéine pouvait s'infiltre dans 15 le site actif de la valyl-tRNA synthétase pour former des Cys-tRNA^{Val} erronés, aptes à corriger la substitution de la cystéine par la valine dans le site actif de la thymidylate synthase. L'excès de valine préviendrait la formation de ces Cys-tRNA^{Val} erronés.

Exemple 2 : Construction d'une souche d'*E. coli* comportant une mutation faux-sens Cys->Ile au site actif de la thymidylate synthase et créant une exigence 20 nutritionnelle pour la thymine, la thymidine ou la cystéine.

La construction correspondante est également conduite pour remplacer la cystéine en position 146 de la thymidylate synthase, par mutagénèse dirigée à l'aide de l'oligonucléotide 2, suivant le même protocole que dans l'Exemple 1.

Oligodéoxynucléotide 2 :

25 5'pTGGATAAAATGGCGCTGGCACCGATACATGCATTCTCCAGTTCTATGT

Le plasmide pTS2 ainsi obtenu propage l'allèle thyA:Ile146, dans lequel la position 146 occupée dans le gène thyA sauvage par le codon UGC de la cystéine est occupée par le codon AUA de l'isoleucine. La souche propageant l'allèle plasmidique thyA:Ile146, β5274, se révèle exiger l'apport nutritionnel de thymine, de thymidine ou de cystéine en excès, tout comme la souche β5366. La suppression phénotypique de la souche β5274 par la cystéine est abolie par 0,1 mM d'isoleucine, tout comme celle de la souche β5366 par la valine. Ainsi, tout se passe comme si l'isoleucyl-tRNA synthétase était capable de former des Cys-tRNA^{Ile} erronés en présence d'un excès de cystéine, et que cette formation erronée était prévenue par la présence d'un excès 30 d'isoleucine. 35

Exemple 3 : Sélection de mutants du code génétique mésincorporant la cystéine au lieu de la valine par culture serielle en liquide et caractérisation génétique des mutants de la valyl-tRNA synthétase ainsi obtenus.

La souche β 5366 portant l'allèle faux-sens thyA:Val146 sur le plasmide pTS1 est cultivée en milieu minéral MS glucose (2 g/l, Richaud et coll., 1993) supplémenté avec 0,3 mM de thymidine pendant 24 h à 30°C en aérobiose. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du milieu minéral MS désoxygéné. Un milieu nutritif désoxygéné contenant 10 ml de milieu minéral MS glucose additionné de 1,5 mM de cystéine est inoculé au 1/100 à l'aide des cellules lavées. Les cellules sont ensuite cultivées en anaérobiose pendant 24 h à 30°C et un tube frais contenant 10 ml de milieu minéral MS glucose cystéine désoxygéné est inoculé avec une dilution au 1/100 de la culture en phase stationnaire précédente. Cette procédure est répétée 26 fois. A l'issue de cette propagation serielle, 12 clones de la culture liquide sont isolés sur boîtes de milieu minéral MS glucose (2 g/l) thymidine (0,3 mM) en aérobiose et sauvegardés en suspension dans le même milieu liquide à - 80°C. Les douze clones sont testés sur des boîtes contenant du milieu minéral MS glucose additionné de facteurs nutritionnels. Tous ces clones se révèlent exiger la thymine ou la thymidine comme facteur de croissance, à moins que de la cystéine soit présente dans le milieu de culture, à une concentration d'au moins 1,5 mM.

Deux tels clones sont choisis pour une caractérisation génétique approfondie, β 8144 et β 8146. Des expériences de transduction par le phage P1 du caractère de résistance à la kanamycine, introduit dans le locus nrdD voisin du gène valS de la valyl-tRNA synthétase (97 mn du chromosome d'*E. coli* K12) sont effectuées à l'aide des souches β 8144 et β 8146. Dans les deux cas, environ la moitié des transductants résistant à la kanamycine montrent également une dépendance nutritionnelle pour la thymidine suppressible par la cystéine exogène, à la concentration d'au moins 1,5 mM. Cette proportion est en accord avec la distance génétique entre les gènes valS et nrdD (0,4 mn) et laisse supposer que le phénotype de suppression de la mutation faux-sens Cys->Val au site actif de la thymidylate synthase par de faibles concentrations de cystéine est causé par l'altération génétique du locus valS.

La fixation d'une altération génétique dans le gène valS des souches adaptées est confirmée par séquençage de ce locus : un A changé en C cause le remplacement de la lysine à la position 277 par la glutamine dans les deux souches adaptées β 8144 et β 8146. Le séquençage est effectué sur une matrice obtenue par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) réalisée dans des conditions décrites par Sambrook et

coll. (1989). La réaction d'amplification est réalisée dans 100 µl d'une solution contenant 10 ng d'ADN génomique des souches β 8144 ou β 8146, 20 pmoles de chaque amorce, 40 nmoles d'un mélange équimolaire des 4 désoxynucléotides triphosphate, 10 µl d'un tampon composé de 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl et 5 20 mM MgCl₂, en présence de 1 à 2 unités de Vent polymérase (Biolabs). Pour chaque réaction, 30 cycles de polymérisation sont accomplis, en utilisant un amplificateur d'ADN (Perkin-Elmer Cetus), comme suit : la dénaturation est effectuée à 94°C pendant 5 min pour le 1er cycle et 1 min pour les cycles suivant, l'hybridation à 58°C pendant 1 min et l'elongation à 72°C pendant 3 min pour les 29 premiers cycles et 10 pendant 10 min pour le dernier cycle. Les oligonucléotides 7 et 8 sont utilisés pour l'amplification du gène.

Oligodéoxynucléotide 7 :

5'GGGAATTCGGTGTGAAATTGCCGCAGAACG

Oligodéoxynucléotide 8 :

15 5'GGCAAGCTTCCAGTATTCACGGGGAGTTATGC

Les fragments de PCR ainsi obtenus sont purifiés en utilisant le kit QIAquick (Qiagen) et transmis à la société Genaxis pour en déterminer la séquence.

20 **Exemple 4 : Suppression phénotypique par des précurseurs métaboliques de la cystéine.**

L'exigence nutritionnelle en cystéine des souches adaptées β 8144 et β 8146 est mise à profit pour caractériser des précurseurs métaboliques qui puissent se substituer à la cystéine dans le milieu de culture sans donner lieu à la dégradation par oxydation. La S-carbamyl-L-cystéine (3 mM), la S-méthyl-L-cystéine (3 mM) et l'acide L-thiazolidine-4-carboxylate (2 mM) se révèlent capables de remplacer la cystéine comme facteur de croissance des souches adaptées β 8144 et β 8146, au lieu de la thymidine ou de la thymine. Les mêmes composés se révèlent capables de satisfaire l'exigence en cystéine d'un mutant cysN::kan (souche JT1, procurée par M. Berlyn, Coli Genetic Stock Center, Yale University, USA (Levh et al., 1988)). Toutefois, 25 l'addition d'aucune de ces substances ne permet la croissance de la souche β 1308 portant une délétion chromosomique du gène thyA de la thymidylate synthase, 30 excluant ainsi leur contamination par des traces de thymine ou de thymidine.

Exemple 5 : Sélection de mutants du code génétique mésincorporant la cystéine au lieu de la valine par isolement sur milieu solide et caractérisation génétique des mutants de la valyl-tRNA synthétase mésincorporant la cystéine.

La souche β 5366 portant l'allèle faux-sens thyA:Val146 sur le plasmide pTS1 5 est transduite avec un lysat du phage P1 récolté sur une souche auxiliaire d'*E. coli* (β 7170, Bouzon et al., 1997) dans le chromosome de laquelle un marqueur de résistance à la kanamycine avait été introduit au locus *nrdD*, voisin du locus *valS* du 10 gène de la valyl-tRNA synthétase, produisant ainsi la souche β 5419. Un allèle mutateur du gène *dnaQ* est introduit extemporanément par transduction de la souche β 5419 à 15 l'aide d'un lysat du phage P1 récolté sur une souche auxiliaire (MS2131, Shapiro 1990) portant un marqueur de résistance à la tétracycline *dnaQ::miniTn10*. Un tel clone résistant à la tétracycline et montrant un taux de mutation spontanée amplifié environ 1000 fois (pour l'acquisition de la résistance à la streptomycine) est cultivé à 30°C en milieu minimum glucose en présence de thymidine (0,3 mM). Après 24 h, les cellules 20 sont récoltées, lavées deux fois dans un volume identique de milieu de culture sans thymidine. Un volume de 0,1 ml de la suspension résultante, correspondant à environ 10⁸ bactéries, est étalé à la surface d'une série de boîtes de Pétri contenant une concentration de S-carbamyl-L-cystéine variant entre 0 et 8 mM par incrément de 1 mM additionnant du milieu minéral MS glucose (2 g/l). La même procédure est 25 appliquée à la souche non mutatrice β 5419, au gène *dnaQ* sauvage. L'ensemble des boîtes de Pétri est incubé 96 h à 30°. Des colonies apparaissent sur les boîtes ayant une concentration de S-carbamyl-L-cystéine dépassant 2 mM dans le seul cas où l'allèle mutateur *dnaQ::miniTn10* a été introduit dans la souche testée.

Un lysat du phage P1 récolté à partir d'un tel clone est employé pour transduire 25 la souche β 5366 portant l'allèle plasmidique thyA:Val146. Environ la moitié des transductants résistant à la kanamycine se montrent capables de croître en présence de 3 mM de S-carbamyl-L-cystéine et en absence de thymine ou de thymidine, parmi lesquels la souche β 5455. L'autre moitié des transductants est incapable et exige la thymine ou la thymidine pour proliférer, tout comme la souche β 5366. Cette proportion 30 entre les phénotypes s'accorde avec la distance génétique entre les locus *valS* et *nrdD* (0,4 mn). Ainsi, la suppression de la mutation faux-sens de thyA Cys->Val par une faible concentration de cystéine exogène pourrait résulter d'une altération du gène de la valyl-tRNA synthétase. Le locus *valS* d'une des souches obtenues par transduction de β 5366 et capables de croître en présence de 3 mM de S-carbamyl-L-cystéine et en 35 absence de thymine ou de thymidine, désignée β 5455, est amplifié par réaction de

polymérisation en chaîne et séquencé comme il est décrit dans l'Exemple 3. Un A changé en C cause le remplacement de la thréonine à la position 222 par la proline, confirmant ainsi la fixation d'une altération génétique dans le gène *valS* de la souche β 5455.

5

Exemple 6 : Sensibilité des mutants de la valyl-tRNA synthétase à des acides aminés non canoniques.

Les souches β 5455, β 8144 et β 8146 sont testées pour leur sensibilité à des acides aminés artificiels qui présentent une ressemblance stérique avec la valine. Le 10 test est réalisé sur des boîtes de milieu minéral MS glucose supplémenté avec de la thymidine. Les cellules sont cultivées en milieu aérobie (minéral MS glucose 0,3 mM thymidine) pendant 24 h à 30°C et diluées au 1/250 dans du milieu minéral MS. 0,5 ml de cette suspension cellulaire sont étalés sur boîtes de Pétri contenant 25 ml de milieu minéral MS glucose. Un puits est ensuite évidé au centre de la boîte et rempli avec 15 0,1 ml d'une solution d'un acide aminé :

- (1) 100 mM L-2-amino-butyrate
- (2) 100 mM L-2-amino-valérate
- (3) 100 mM L-2,3-diamino-propionate
- (4) 50 mM L-3-thiol-2-amino-butyrate.

20 Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 h à 30°C et l'apparition éventuelle sur les boîtes d'une zone d'inhibition autour du puits est enregistrée. Les diamètres des zones d'inhibition de croissance atténuées sur des boîtes de Pétri sont mesurés :
L-2-amino-butyrate : 5,2 cm (β 5455), 5,7 cm (β 8144), 6,7 cm (β 8146) ;
L-2-amino-valérate : 2,1 cm (β 5455), 1,5 cm (β 8144), 6,7 cm (β 8146) ;
25 L-2,3-diamino-propionate : 2,3 cm (β 5455), 2,7 cm (β 8144), 1,9 cm (β 8146) ;
L-3-thiol-2-amino-butyrate : 2,0 cm (β 5366), 4,6 cm (β 5455), 4,0 cm (β 8144), 4,0 cm (β 8146).

30 Le L-2-amino-butyrate, le L-2-amino-valérate et le L-2,3 diamino-propionate aux concentrations indiquées sont sans effet sur la souche β 5366 à l'allèle *valS* sauvage, mais inhibent la croissance des souches portant un gène *valS* muté. Le L-3-thiol-2-amino-butyrate inhibe la croissance de toutes les souches, mais on peut remarquer une inhibition plus importante sur les souches mutées. Ainsi, tout se passe comme si les mutants de la valyl-tRNA synthétase avaient une spécificité élargie les rendant capables de charger des tRNA^{Val} avec des acides aminés qui ne peuvent être 35 incorporés par la forme sauvage de l'enzyme.

Exemple 7 : Incorporation de l'acide aminé non canonique α -aminobutyrate dans les protéines d'une souche d'E. coli mutée dans la valyl-tRNA synthétase.

Un lysat de phage P1 obtenu à partir de la souche β 5455 (voir exemple 5), a été employé pour transduire la souche CU505 portant une délétion Δ ilvCABD et une mutation leu la rendant auxotrophe pour la valine, l'isoleucine et la leucine. La souche CU505 a été obtenue auprès du Coli Genetic Stock Center, à Yale University (USA). Des clones transductants ont été sélectionnés sur des boîtes LB kanamycine et testés pour leur sensibilité à l'amino-butyrate (3 mM) en milieu solide MS glucose (2 g/l) contenant 0,3 mM de chacun des trois acides aminés valine, isoleucine et leucine. Environ 50 % des clones transductants ne pouvaient croître dans ces conditions, indiquant la co-transduction de l'allèle valS:T222P et le marqueur de résistance nrdD::kan (voir exemple 5). L'un des clones transductants, désigné β 5498, a été utilisé pour démontrer l'incorporation d'amino-butyrate en remplacement de la valine, en comparaison avec CU505. Les deux souches ont été cultivées à 30°C en milieu liquide MS glucose (2 g/l) contenant le dipeptide Ile-Leu à la concentration de 0,3 mM et le dipeptide Ile-Val à la concentration de 0,02 mM soit en présence de 0,2 mM de L-amino-butyrate soit en absence de l'analogue. L'inoculum correspondant à chaque souche provenait d'une préculture en milieu liquide MS glucose (2 g/l) contenant le dipeptide Ile-Leu à la concentration de 0,3 mM et le dipeptide Ile-Val à la concentration de 0,04 mM. Les cultures (50 ml) en phase stationnaire après 24 h à 30°C ont été récoltées par centrifugation. Pour chaque test, le culot a ensuite été ressuspended dans 25 ml d'une solution d'acide trichloroacétique à 100 g/l (TCA 10%) à 4°C, centrifugé, ressuspended dans 5 ml de TCA 10%, centrifugé à nouveau, le culot ressuspended dans du TCA 5%, la suspension incubée à 95°C pendant 30 mn, centrifugée, le culot ressuspended dans 5 ml acétone, centrifugé, le culot ressuspended dans 5 ml acétone, centrifugé, le culot ressuspended dans 5 ml acétone, centrifugé, le culot laissé à sécher. Le résidu ainsi obtenu a été dissous dans 1 ml d'une solution de NH4HCO3 à 50 mM pour être lyophilisé. Le lyophilisat a été dissous dans 2 ml d'acide chlorhydrique 6N contenant 2 g/l de phénol, le mélange scellé dans une ampoule, puis incubé à 110°C pendant 20 h. La concentration des acides aminés de l'hydrolysat a ensuite été quantifiée par dérivatisation par la ninhydrine suivant les instructions préconisées par le fournisseur de l'analyseur Beckman 6300. L'amino-butyrate a été détecté dans l'hydrolysat des protéines seulement dans le cas où de l'amino-butyrate avait été ajouté au milieu de culture, et seulement pour la souche β 5498. La proportion d'amino-butyrate remplaçait un quart de la quantité de valine, correspondant à environ 5

résidus amino-butyrate pour 100 acides aminés des protéines totales. Les résultats détaillés des analyses pour les deux souches CU505 et β 5498 dans les deux conditions de culture sont donnés dans le tableau ci-après.

5 **Composition chimique des protéines extraites de souches auxotropes pour la valine et cultivées en limitation de valine, avec ou sans amino-butyrate**

Acide aminé incorporé dans les protéines	CU505 wt valS -Abu	β 5498 valS T222P -Abu	CU505 wtvalS +Abu	β 5498 valS T222P + Abu
Abu	0	0	0	0,20
Val	0,83	0,79	0,83	0,61
Val + Abu	0,83	0,79	0,83	0,81
Ala	1,32	1,28	1,32	1,22
Ile	0,61	0,61	0,61	0,61

Résultats exprimés en équivalents Leu

10

Exemple 8 : Sélection de nouveaux mutants du code génétique à partir d'une souche mutatrice par isolement sur milieu solide.

La souche β 5419, exprimant l'allèle inactif thyA:Val146 à partir d'un plasmide et portant le marqueur λ EnrdD::kan dans le chromosome, ainsi qu'en rend compte sa construction décrite dans l'Exemple 5, a été transduite à l'aide d'un lysat du phage P1 récolté sur la souche TAD, portant un marqueur mutateur λ EmutS::spc, conférant la résistance à la spectinomycine, en sélectionnant sur milieu solide LB contenant de la spectinomycine (25 mg/l) pour obtenir la souche β 5555. Le phénotype mutateur de cette souche a été démontré en dénombrant la fréquence des mutants résistant à la rifamycine. En suivant la procédure expérimentale décrite dans l'Exemple 5, des clones capables de croître à 30°C en milieu minéral glucose sans thymidine en présence de 2 à 5 mM de S-carbamoyl-L-cystéine (SCC), ont été obtenus. Trois d'entre ces clones ont servi à préparer des lysats du phage P1, qui ont été utilisés pour transduire la souche β 5366, en sélectionnant pour la résistance à la kanamycine, suivant la procédure de l'Exemple 5. Pour chacun des trois lysats, environ la moitié des transductants étaient capables de croître en milieu solide minéral glucose contenant

3 mM de SCC, indiquant la proximité d'une mutation supprimant l'allèle faux-sens thyA:C146V et du marqueur *nrdD::kan*. Le locus *valS* des trois souches β 5479, β 5485 et β 5486, chacune correspondant à un transductant SCC-suppressible obtenu à partir d'un des trois lysats a été amplifié par PCR et séquencé comme il est décrit dans 5 l'Exemple 3. Une mutation ponctuelle différente a été trouvée pour chacune des trois souches, à savoir Arg 223 changée en His dans la souche β 5479, Val 276 changée en Ala dans la souche β 5485 et Asp 230 changée en Asn dans la souche β 5486. Ainsi, chaque clone présentant un phénotype de suppression du mutant faux-sens Cys 146 Val de thyA, présente également la sensibilité à l'amoно-butyrat. Chacun de ces 10 clones s'est révélé porter une mutation ponctuelle différente dans le gène *valS*, validant le cible sélectif comme moyen de diversifier l'activité de la valyl-tRNA synthétase chez *Escherichia coli*.

BIBLIOGRAPHIE

- BAIN J.D., E.S. DIALA, C.G. GLABE, D.A. WACKER, M.H. LYTTLE, T.A. DIX and A.R. CHAMBERLIN, 1991 ; Site-specific incorporation of nonstructural residues during in vitro protein biosynthesis with semisynthetic aminoacyl-tRNAs, *Biochemistry* 30: 5411-5421.
- BOUZON, M. and P. MARLIERE, 1997 ; Human deoxycytidine kinase as a conditional mutator in *Escherichia coli*. *C.R. Acad. Sci. Paris* 320: 427-434.
- KUNKEL, T.A., and J.D. ROBERTS, 1987 ; Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* 154: 367-382.
- LEMEIGNAN, B., P. SONIGO and P. MARLIERE, 1993 ; Phenotypic suppression by incorporation of an alien amino acid. *J. Mol. Biol.* 231: 161-166.
- LEVH, T.F., J.C. TAYLOR and G.D. MARKHAM, 1988 ; The sulfate activation locus of *Escherichia coli* K12: cloning, genetic, and enzymatic characterisation. *J. Biol. Chem.* 263: 2409-2416.
- PARSOT, C., 1986 ; Evolution of biosynthetic pathways: a common ancestor for threonine synthase, threonine dehydratase and D-serine dehydratase. *EMBO J.*, 5: 3013-3019.
- RICHAUD, C., D. MENGIN-LECREULX, S. POCHET, E.J. JOHNSON, G.N. COHEN et al., 1993 ; Directed Evolution of Biosynthetic pathways. *J. Biol. Chem.* 268: 26827-26835.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH and T. MANIATIS, 1989 ; Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SANGER, F., S. NICKLEN and A.R. COULSON, 1977 ; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74: 5463-5467.
- SHAPIRO, J.A 1990 ; Action of a transposable element in coding sequence fusions. *Genetics* 126: 293-299.

REVENDICATIONS

1. Méthode permettant à des cellules d'acquérir la capacité de produire une protéine dont la séquence d'acides aminés comprend au moins un acide aminé non conventionnel, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :
 - a) la transformation desdites cellules par au moins une introduction d'une mutation faux-sens au niveau d'un codon cible d'un gène codant pour une protéine nécessaire à la croissance desdites cellules, ladite protéine synthétisée à partir du gène ainsi muté n'étant plus fonctionnelle ;
 - b) le cas échéant la culture des cellules obtenues à l'étape a) dans un milieu de culture contenant un nutriment compensant la perte de fonctionnalité de ladite protéine ainsi mutée ; et
 - c) la culture des cellules obtenues à l'étape a) ou b) dans un milieu de culture contenant l'acide aminé codé par ledit codon cible.
- 15 2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que le milieu de culture de l'étape c) ne contient pas le nutriment nécessité par la perte de fonctionnalité de ladite protéine mutée.
- 20 3. Méthode selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que l'étape c) de culture desdites cellules comprend une série de cultures desdites cellules dans un milieu de culture contenant l'acide aminé codé par ledit codon cible, chacune desdites cultures de la série étant effectuée jusqu'à obtention de la phase stationnaire de croissance et suivie d'un lavage des cellules obtenues, le nombre de cultures de la série étant suffisant pour permettre la sélection de mutations augmentant la suppression de ladite mutation faux-sens dudit gène muté.
- 25 4. Méthode selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la mutation faux-sens est choisie parmi les mutations faux-sens qui ne réversent spontanément qu'à une très faible fréquence, de l'ordre d'un organisme parmi au moins 10^{15} .
- 30 5. Méthode selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la mutation faux-sens transforme un codon cible d'un gène codant pour une protéine nécessaire à la croissance de ladite cellule en un codon qui comparativement au codon cible présente un changement d'au moins deux bases, de préférence trois bases.
- 35 6. Méthode selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le codon cible code pour un acide aminé de faible volume stérique.

7. Méthode selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le codon cible code pour un acide aminé amphiphile.

8. Méthode selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le codon cible code pour un acide aminé dont le volume stérique est inférieur ou 5 sensiblement égal au volume stérique de l'acide aminé codé par la mutation faux-sens.

9. Méthode selon l'une des revendications 5 à 8, caractérisée en ce que le codon cible code pour la cystéine.

10. Méthode selon l'une des revendications 5 à 9, caractérisée en ce que l'acide aminé codé par la mutation faux-sens est la valine ou l'isoleucine.

10 11. Méthode selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que l'étape a) de transformation desdites cellules est réalisée au moyen d'un vecteur comprenant une séquence dudit gène codant pour une protéine nécessaire à la croissance desdites cellules comportant ladite mutation faux-sens.

15 12. Méthode selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit vecteur est un vecteur plasmidique.

16 13. Méthode de sélection de cellules capables de produire une protéine dont la séquence d'acides aminés comprend au moins un acide aminé non conventionnel caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes a), le cas échéant b), et c) d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 12, et la sélection des cellules capables de 20 croître à l'étape c).

17 14. Méthode de sélection de cellules selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une étape d) de culture des cellules obtenues à l'étape c) dans un milieu de culture contenant ledit acide aminé codé par ledit codon cible, la concentration dudit acide aminé pouvant être à une concentration supérieure à 25 la concentration dudit acide aminé utilisée à l'étape c), et le choix des cellules sensibles à la concentration dudit acide aminé utilisée à l'étape d).

18 15. Méthode de sélection de cellules selon l'une des revendications 13 et 14, caractérisée en ce que l'aminoacyl-tRNA synthétase reconnaissant l'acide aminé codé par ladite mutation faux-sens desdites cellules sélectionnées est capable de 30 charger sur un de ses tRNA associés un acide aminé non conventionnel ou un acide aminé autre que ledit acide aminé codé par ladite mutation faux-sens.

19 16. Méthode de sélection de cellules selon la revendication 15, caractérisée en ce que la séquence nucléique du gène codant pour ladite aminoacyl-tRNA synthétase comporte au moins une mutation comparée à la séquence du gène 35 sauvage correspondant.

17. Méthode de sélection de cellules selon la revendication 16, caractérisée en ce que ladite mutation n'a pas été introduite par une technique de recombinaison génétique.

18. Cellule obtenue par une méthode selon l'une des revendications 1 à 17.

5 19. Cellule isolée capable de produire une protéine dont la séquence d'acides aminés comprend au moins un acide aminé non conventionnel, caractérisée en ce qu'elle comprend une aminoacyl-tRNA synthétase reconnaissant un acide aminé donné capable de charger sur un de ses tRNA associés un acide aminé non conventionnel ou un acide aminé autre que ledit acide aminé donné, et en ce que la 10 séquence nucléique du gène codant pour ladite aminoacyl-tRNA synthétase comporte au moins une mutation comparée à la séquence du gène sauvage correspondant, ladite mutation n'ayant pas été introduite par une technique de recombinaison génétique.

15 20. Cellule selon la revendication 18 ou 19, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule procaryote ou eucaryote.

21. Cellule selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule procaryote.

22. Cellule selon l'une des revendications 18 à 21, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les cellules suivantes déposées à la CNCM (Collection 20 Nationale de Culture de Microorganismes, Paris, France) :

- a) souche *E. coli* déposée à la CNCM sous le N° I-2025 le 25 mai 1998,
- b) souche *E. coli* déposée à la CNCM sous le N° I-2026 le 25 mai 1998, et
- c) souche *E. coli* déposée à la CNCM sous le N° I-2027 le 25 mai 1998.
- d) souche *E. coli* déposée à la CNCM sous le N° I-2339 le 26 octobre 1999,
- e) souche *E. coli* déposée à la CNCM sous le N° I-2340 le 26 octobre 1999, et
- f) souche *E. coli* déposée à la CNCM sous le N° I-2341 le 26 octobre 1999.

23. Utilisation d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 17 pour la production de protéine dont la séquence d'acides aminés comprend au moins un acide aminé non conventionnel.

30 24. Utilisation d'une cellule selon l'une des revendications 18 à 22 pour la production de protéine dont la séquence d'acides aminés comprend au moins un acide aminé non conventionnel.

35 25. Procédé de production d'une protéine dont la séquence d'acides aminés comprend au moins un acide aminé non conventionnel, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) le cas échéant, la sélection d'une cellule par une méthode selon l'une des revendications 13 à 17 ;
- b) la culture de ladite cellule sélectionnée à l'étape a) ou d'une cellule selon l'une des revendications 18 à 22 dans un milieu de culture et des conditions de culture permettant la croissance de ladite cellule ; et
- 5 c) l'isolement de ladite protéine comprenant au moins un acide aminé non conventionnel à partir du surnageant de culture et/ou du culot cellulaire obtenu à l'étape b).

26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que ledit milieu de culture de l'étape b) permettant la croissance de ladite cellule contient ledit acide aminé non conventionnel ou un de ses précurseurs.

10 27. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que ledit acide aminé non conventionnel est synthétisé par ladite cellule.

15 28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que la synthèse dudit acide aminé non conventionnel est augmentée par modification génétique de ladite cellule.

29. Procédé selon l'une des revendications 25 à 28, caractérisé en ce que ladite cellule est auxotrophe pour l'acide aminé codé par ledit codon cible.

30. Procédé selon l'une des revendications 25 à 29, caractérisé en ce que 20 ladite cellule comprend un gène d'intérêt homologue ou hétérologue dont la séquence codante comporte au moins un codon cible.

31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que l'étape b) comprend les composés nécessaires à l'induction de la synthèse de la protéine codée par ledit gène d'intérêt.

25 32. Procédé selon la revendication 30 ou 31, caractérisé en ce que l'activité biologique de la protéine codée par ledit gène d'intérêt est au moins partiellement conservée après l'incorporation dudit acide aminé non conventionnel au niveau du codon cible dudit gène d'intérêt.

33. Procédé selon l'une des revendications 25 à 32, caractérisé en ce que 30 l'acide aminé non conventionnel est choisi parmi les acides aminés non conventionnels de formule I de configuration L



dans laquelle :

10 R₁ ou R₂ représente des radicaux contenant un groupe fonctionnel capable de réagir de manière sélective.

34. Procédé selon la revendication 33, caractérisé en ce que le groupe fonctionnel est choisi parmi les groupes aldéhyde, cétone, éthényle, éthynyle ou nitrile.

15 35. Procédé selon l'une des revendications 25 à 34, pour la fonctionnalisation de protéine.

36. Procédé de purification de protéine, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) l'incorporation dans la séquence d'acides aminés de ladite protéine d'un acide aminé non conventionnel contenant un groupe fonctionnel capable de réagir de manière sélective par un procédé selon l'une des revendications 25 à 35 ;
- b) la mise en contact de la solution contenant la protéine obtenue à l'étape a) avec un support comprenant un composé capable de réagir spécifiquement avec ledit groupe fonctionnel et de fixer spécifiquement ladite protéine ; et
- c) l'isolement de ladite protéine fixée sur le support.

25 37. Procédé de fixation d'une protéine sur un composé chimique ou biochimique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) l'incorporation dans la séquence d'acides aminés de ladite protéine par un procédé selon l'une des revendications 25 à 35 d'un acide aminé non conventionnel contenant un groupe fonctionnel capable de réagir de manière sélective ;
- b) la mise en contact de la protéine obtenue à l'étape a) avec ledit composé chimique ou biochimique comprenant un groupe capable de réagir spécifiquement avec ledit groupe fonctionnel dans un milieu permettant la réaction.

35 38. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce que ledit composé chimique ou biochimique est lui-même fixé sur un support solide ou est un composé constitutif d'un support solide.

39. Procédé selon la revendication 37 pour la préparation d'un complexe protéique.

40. Procédé selon la revendication 39, caractérisé en ce que la protéine fixée ou le composé chimique ou biochimique est choisi parmi les composés thérapeutiques, cosmétiques ou diagnostiques.

41. Procédé selon la revendication 39 ou 40, caractérisé en ce que le composé chimique ou biochimique est choisi parmi les composés capables de modifier l'activité biologique de la protéine fixée.

42. Procédé selon la revendication 39 ou 40, caractérisé en ce que le composé chimique ou biochimique est choisi parmi les composés dont l'activité biologique peut être modifiée par la protéine fixée.

43. Procédé selon l'une des revendications 39 à 42, caractérisé en ce que le composé chimique ou biochimique est choisi parmi les composés comprenant une protéine, un polynucléotide, un acide gras, un sucre ou un polymère naturel ou synthétique.

44. Protéine obtenue par un procédé selon l'une des revendications 25 à 36.

45. Protéine selon la revendication 44, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine recombinante.

46. Complex protéique obtenu par un procédé selon l'une revendications 39 à 43.

47. Utilisation d'une protéine selon la revendication 44 ou 45, ou d'un complexe protéique selon la revendication 46 comme réactif de diagnostic.

48. Procédé de diagnostic, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une protéine selon la revendication 44 ou 45, ou un complexe protéique selon la revendication 46.

49. Nécessaire de diagnostic, caractérisé en ce qu'il contient une protéine selon la revendication 44 ou 45, ou un complexe protéique selon la revendication 46.

50. Utilisation d'une protéine selon la revendication 44 ou 45, d'un complexe protéique selon la revendication 46 ou d'une cellule selon l'une des revendications 18 à 22 pour la préparation d'une composition pharmaceutique ou cosmétique.

51. Composition pharmaceutique ou cosmétique comprenant une protéine selon la revendication 44 ou 45, un complexe protéique selon la revendication 46 ou une cellule selon l'une des revendications 18 à 22.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02628

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEMEIGNAN B. ET AL.: "Phenotypic suppression by incorporation of an alien amino acid" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 231, no. 2, May 1993 (1993-05), pages 161-166, XP002113371 cited in the application the whole document ---	1-6, 8, 11-13, 18, 20, 21, 23-25, 29, 33, 44, 45, 47-51
A	DÖRING V. ET AL.: "Reassigning Cysteine in the Genetic Code of Escherichia coli" GENETICS, vol. 150, no. 2, October 1998 (1998-10), pages 543-551, XP002113372 page 546, column 2, line 4 -page 547, column 1, line 9 ---	1-17 -/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

23 December 1999

24/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schönwasser, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/02628

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAIN J.D. ET AL.: "Ribosome-mediated incorporation of a non-standard amino acid into a peptide through expansion of the genetic code" NATURE, vol. 356, 9 April 1992 (1992-04-09), pages 537-539, XP002113373 the whole document -----	
A	IBBA M.: "STRATEGIES FOR IN VITRO AND IN VIVO TRANSLATION WITH NON-NATURAL AMINO-ACIDS" BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS, vol. 13, 1996, pages 197-216, XP002109693 ISSN: 0264-8725 the whole document -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 99/02628

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12P21/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LEMEIGNAN B. ET AL.: "Phenotypic suppression by incorporation of an alien amino acid" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 231, no. 2, mai 1993 (1993-05), pages 161-166, XP002113371 cité dans la demande le document en entier ---	1-6, 8, 11-13, 18, 20, 21, 23-25, 29, 33, 44, 45, 47-51
A	DÖRING V. ET AL.: "Reassigning Cysteine in the Genetic Code of Escherichia coli" GENETICS, vol. 150, no. 2, octobre 1998 (1998-10), pages 543-551, XP002113372 page 546, colonne 2, ligne 4 -page 547, colonne 1, ligne 9 ---- -/-	1-17

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

³ Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23 décembre 1999

24/01/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Schönwasser, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 99/02628

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BAIN J.D. ET AL.: "Ribosome-mediated incorporation of a non-standard amino acid into a peptide through expansion of the genetic code" <i>NATURE</i>, vol. 356, 9 avril 1992 (1992-04-09), pages 537-539, XP002113373 le document en entier</p> <p>-----</p> <p>IBBA M.: "STRATEGIES FOR IN VITRO AND IN VIVO TRANSLATION WITH NON-NATURAL AMINO-ACIDS" <i>BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS</i>, vol. 13, 1996, pages 197-216, XP002109693 ISSN: 0264-8725 le document en entier</p> <p>-----</p>	
1		